



Avaliação da inibição enzimática de complexos metálicos e ligantes de interesse farmacêutico

Palavras-Chave: Fosfatase ácida, Acetilcolinesterase, Inibição, Enzima, *drug discovery*

Autores(as):

Lucas Alvim Santos Romani, IQ – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Camilla Abbehausen, IQ - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Metalofármacos são uma classe de medicamentos em ascensão, pois a combinação de íons metálicos com moléculas orgânicas oferece oportunidades interessantes para projetar agentes terapêuticos mais eficazes e com menor toxicidade em comparação com alguns tratamentos tradicionais. Tendo isto em vista, esta pesquisa se propõe a estudar a viabilidade de complexos metálicos como possíveis inibidores de enzimas centrais em doenças comuns. São elas a fosfatase ácida e a acetilcolinesterase.

A inibição da fosfatase ácida pode ser uma estratégia eficaz no tratamento de algumas condições médicas, como osteoporose e câncer de próstata. A osteoporose é uma doença caracterizada pela perda gradual da massa óssea e pela deterioração da estrutura óssea, aumentando o risco de fraturas e lesões. A reabsorção óssea excessiva pelos osteoclastos é um dos principais fatores que contribuem para a osteoporose. Portanto, inibir a atividade dos osteoclastos pode ajudar a reduzir a reabsorção óssea e prevenir a perda óssea progressiva.^[1, 2]

Além disso, a fosfatase ácida também é produzida em grandes quantidades por algumas células cancerígenas, como as células do câncer de próstata. Nesse caso, a inibição da fosfatase ácida pode ser usada como uma estratégia de tratamento para retardar a progressão do câncer de próstata e melhorar a eficácia dos tratamentos convencionais^[10, 11]

Já se tratando da acetilcolinesterase, de acordo com a hipótese colinérgica, a doença de Alzheimer é causada pela perda de neurônios colinérgicos no núcleo basal do cérebro, o que leva a uma redução na produção de acetilcolina (ACh) no cérebro. ACh é um neurotransmissor importante que está envolvido na memória e aprendizagem, e a redução em sua produção pode causar os déficits cognitivos que são característicos da doença de Alzheimer.^[3, 4, 5]

A hipótese levou ao desenvolvimento de medicamentos chamados inibidores da colinesterase, que aumentam os níveis de ACh no cérebro, bloqueando a enzima que a degrada. Esses medicamentos são usados para tratar os sintomas da doença de Alzheimer e acredita-se que melhorem a função cognitiva em alguns pacientes.

Deste modo, espera-se estudar a inibição destas duas enzimas *in vitro*, que é o primeiro passo da *drug discovery*, com o intuito de entender como diferentes ligantes alteram a atuação do complexo.

METODOLOGIA:

Síntese dos ligantes chalconas

Os ligantes derivados de chalconas, preparados pelo nosso grupo de pesquisa, são: 1-(2-hidroxifenil)-3-[4-(fenilmetoxi)fenil]-2-propen-1-ona ou benziloxichalcona (BC) e 1-(4-fluor-2-hidroxifenil)-3-[4-(fenilmetoxi)fenil]-2-propen-1-ona ou BC fluorada (BCF).

As sínteses da BC e BCF são muito similares e seguem métodos adaptados da literatura^[6], mudando-se apenas os reagentes de partida. A **Figura 1** ilustra a reação de síntese destes ligantes.

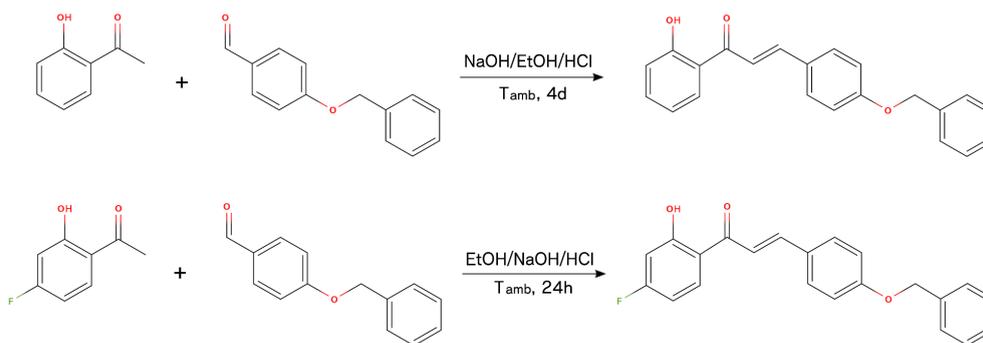


Figura 1: Reações de síntese dos ligantes BC e BCF, respectivamente.

Síntese dos complexos de cobre

De forma similar à síntese dos ligantes, a reação de complexação com o metal é muito semelhante para ambos os ligantes e segue uma metodologia da literatura^[7].

- Complexo homoligante da BC e BCF

Em um balão de fundo redondo, o respectivo ligante é dissolvido em metanol, com auxílio de agitação magnética. Em seguida é adicionada a trietilamina. Uma solução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é preparada com metanol, e então esta é adicionada gota a gota ao meio reacional. A agitação é mantida por 12h à temperatura ambiente, e o produto sólido da reação é filtrado, lavado com metanol gelado e seco a vácuo, levando a um rendimento de 50% para a BC e 75% para a BCF.

- Complexos heteroligantes com chalconas e fenantrolina

Este procedimento foi realizado para os dois ligantes tipo chalconas sintetizados. Em um balão de fundo redondo, a respectiva chalcona é dissolvida em diclorometano com auxílio de agitação magnética. Em seguida, 1,10-fenantrolina é dissolvida em metanol e esta solução é adicionada lentamente ao balão.

Uma solução de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é preparada adicionando este sal à metanol, e então esta é transferida gota a gota ao meio reacional. A reação é mantida sob refluxo por 1h, a solução final é filtrada e deixada em repouso evaporando lentamente até a formação de cristais. Os quais são filtrados e lavados com água destilada, etanol e éter etílico gelados, por fim secos à vácuo.

O complexo formado com a BC e fenantrolina será chamado de CuBCphen e sua síntese apresentou 60% de rendimento, enquanto que o complexo formado com BCF e fenantrolina, de CuBCFphen, com rendimento de 75%.

Inibição da fosfatase ácida e da acetilcolinesterase

Os testes de inibição da enzima fosfatase ácida foram realizados seguindo a metodologia de Blum e Schwedt^[8] e os testes de inibição da acetilcolinesterase foram realizados seguindo a metodologia de Ellman^[9]. Para a fosfatase ácida a atividade enzimática foi calculada pela absorbância do 4-nitrofenol em 405 nm e para a acetilcolinesterase foi utilizado o Ácido 2-nitro-5-tiobenzóico em 410 nm. As medidas foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro Agilent HP 8453.

No teste de inibição da fosfatase ácida, em uma cubeta de vidro é adicionado o tampão acetato (pH 5,60), a solução estoque da enzima (fosfatase ácida de batata), a solução contendo o complexo em DMSO e o substrato (p-nitrofenil fosfato (p-NPP)).

Já no teste de inibição da acetilcolinesterase, em uma cubeta de vidro é adicionado o tampão fosfato (pH 8,0), a solução de DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)), a solução de substrato (acetilcolina), a solução contendo a enzima (acetilcolinesterase de enguia elétrica) e a solução de inibidor (complexos em DMSO).

Para determinar as atividades enzimáticas máximas, um teste sem o complexo é realizado, onde a solução do complexo é substituída por tampão. Além disso, para cada teste é necessário a preparação de um branco, com a mesma composição da solução final, porém sem a enzima. A absorbância, após a adição do substrato, foi monitorada em 405 nm a cada 5 min até 20 min para a fosfatase ácida e em 410 nm a cada 30 s até 400 s para a acetilcolinesterase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Caracterização dos complexos

- Infravermelho (IV)

Ao realizar a análise do infravermelho espera-se que haja variações entre os picos observados para o ligante em relação ao complexo. O que indicaria efetivamente a complexação do metal, por meio da sua influência sobre as demais ligações químicas entre os átomos do ligante.

Para ambos os complexos, a **Figura 2** mostra a comparação dos espectros do complexo com o ligante, com as identificações dos picos.

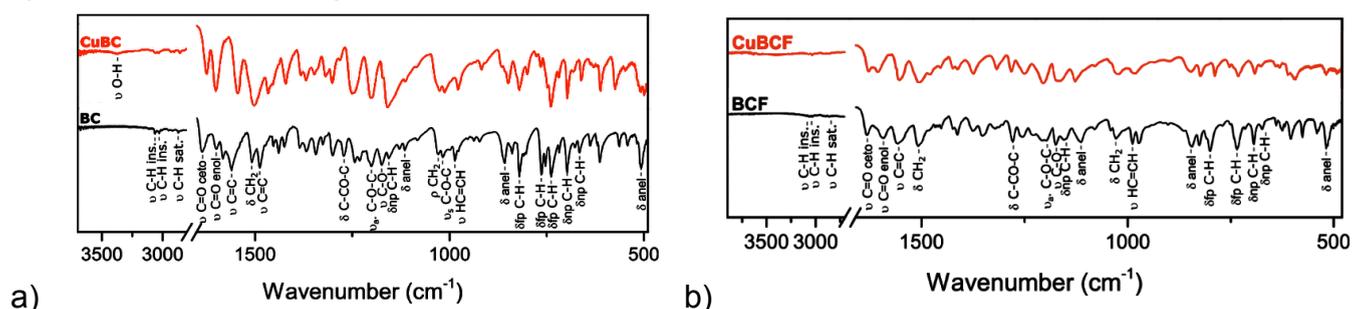


Figura 2: Comparação dos espectros de infravermelho do complexo CuBC com o ligante chalcona BC (a) e do complexo CuBCF com o ligante chalcona BCF (b).

As diferenças observadas entre os picos destes espectros confirmam a formação dos produtos esperados.

- Análise elementar (CHN)

Para garantir que a composição dos complexos estava de acordo com o esperado foram realizadas análises elementares de todos os complexos, os valores esperados e obtidos experimentalmente estão dispostos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Valores esperados e obtidos para a composição de cada complexo

Amostra	%C			%H			%N			Composição
	T*	R**	$\Delta\%$ #	T	R	$\Delta\%$	T	R	$\Delta\%$	
CuBC	71,39	71,32	0,07	4,90	4,84	0,06	0,00	0,01	0,01	CuBC ₂ ·H ₂ O
CuBCF	66,53	66,78	0,25	4,57	4,35	0,22	0,00	0,02	0,02	CuBCF ₂ ·2H ₂ O
CuBCphen	67,10	66,93	0,17	4,14	3,92	0,22	4,60	4,42	0,18	CuBCphenCl
CuBCFphen	64,25	64,04	0,21	3,96	3,89	0,08	4,41	4,45	0,04	CuBCFphenCl ·½ H ₂ O

*T é a composição calculada. **R é a composição experimental. # $\Delta\%$ é a discrepância em porcentagem.

Os valores obtidos experimentalmente condizem com o teoricamente esperado e são, portanto, outro forte indicativo de que o complexo esperado foi obtido.

Inibição da fosfatase ácida e da acetilcolinesterase

Pelos testes realizados seguindo a metodologia descrita, foi possível observar que todos os complexos tiveram impactos na velocidade da reação catalisada pelas enzimas. As reações podem ser acompanhadas pelos gráficos da **Figura 3**, que mostra os dados coletados a partir da adição do substrato. Os valores de redução percentual na velocidade da reação para cada complexo e cada enzima, derivados destes gráficos, estão representados nas **Tabelas 2 e 3**.

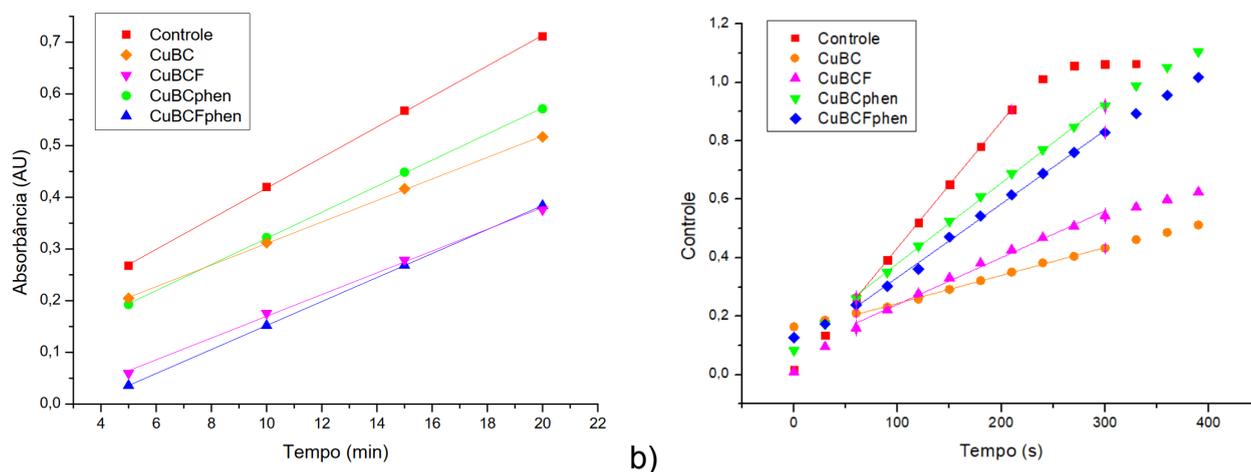


Figura 3: a) Gráfico da inibição da fosfatase ácida, absorção em 405 nm ao longo do tempo, a partir da adição do substrato; b) Gráfico da inibição da acetilcolinesterase, absorção em 410 nm ao longo do tempo, a partir da adição do substrato.

Tabela 2: Valores da velocidade da reação calculados pelo gráfico da **Figura 4a**.

	Controle	CuBC	CuBCF	CuBCphen	CuBCFphen
Velocidade (Au·min ⁻¹)	0,0296	0,021	0,0208	0,0252	0,0232
Redução (%)	-	30	30	17	22

Tabela 3: Valores da velocidade da reação calculados pelo gráfico da **Figura 4b**.

	Controle	CuBC	CuBCF	CuBCphen	CuBCFphen
Velocidade (Au·min ⁻¹)	0,0043	0,0010	0,0016	0,0028	0,0025
Redução (%)	-	78	63	36	42

Por meio destes dados observa-se que os complexos afetam a estabilidade da enzima, onde os complexos contendo apenas as chalconas apresentaram maior inibição, frente aos demais compostos, especialmente ao que diz respeito à colinesterase.

CONCLUSÃO:

De acordo com os resultados expostos acima, os complexos sintetizados apresentaram certa inibição de ambas enzimas, em especial os complexos apenas com ligantes chalcona, que apresentaram alta inibição da acetilcolinesterase.

Este resultado se demonstra promissor, podendo dar origem a diversos outros projetos análogos ou que sigam a cadeia de *drug discovery* destes complexos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Drake, Matthew T., Bart L. Clarke, and Sundeep Khosla. "Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice." *Mayo Clinic Proceedings*. Vol. 83. No. 9. Elsevier, 2008.
- [2] Roodman, G. David. "Mechanisms of bone metastasis." *New England journal of medicine* 350.16 (2004): 1655-1664.
- [3] Sang, Zhipei, et al. "Design, synthesis, in-silico and biological evaluation of novel chalcone derivatives as multi-function agents for the treatment of Alzheimer's disease." *European journal of medicinal chemistry* 180 (2019): 238-252.
- [4] H Ferreira-Vieira, Talita, et al. "Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system." *Current neuropharmacology* 14.1 (2016): 101-115.
- [5] Hampel, Harald, et al. "The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease." *Brain* 141.7 (2018): 1917-1933.
- [6] Singh, A. K. *et al.* Synthesis, characterization and calculated non-linear optical properties of two new chalcones. *J. Mol. Struct.* 1017, (2012) 26–31.
- [7] Prajapati, R. *et al.* Structural characterization and cytotoxicity studies of ruthenium(II)-dmsso-chloro complexes of chalcone and flavone derivatives. *Polyhedron* 29, (2010) 1055–1061.
- [8] U. Blum, G. Schwedt, Inhibition behavior of acid phosphatase and adenosine deaminase phosphodiesterase I as trace metal analysis tools and speciation, *Anal. Chim. Acta* 360 (1998) 101–108.
- [9] Chen, Shi-Chao, et al. "Tricyclic pyrazolo [1, 5-d][1, 4] benzoxazepin-5 (6H)-one scaffold derivatives: synthesis and biological evaluation as selective BuChE inhibitors." *European Journal of Medicinal Chemistry* 147 (2018): 194-204.